



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 A61K 35/74, 35/78, A23L 1/30, C12N 1/20 // A61K 31/35, C07D 311/36</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/07392</p> <p>(43) 国際公開日 1999年2月18日(18.02.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/03460</p> <p>(22) 国際出願日 1998年8月4日(04.08.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/214604 1997年8月8日(08.08.97)</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 大塚製薬株式会社 (OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.)(JP/JP) 〒101-0048 東京都千代田区神田司町2丁目9番地 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 内山成人(UCHIYAMA, Shigeto)(JP/JP) 〒841-0204 佐賀県三養基郡基山町大字宮浦1157-1 Saga, (JP) 上野友美(UENO, Tomomi)(JP/JP) 今泉記代子(IMAIZUMI, Kiyoko)(JP/JP) 〒830-0027 福岡県久留米市長門石5-8-14 第1ハイマート執行302号 Fukuoka, (JP) 久米村恵(KUMEMURA, Megumi)(JP/JP) 〒839-0862 福岡県久留米市野中町1175-1 ファミリーハイツ久留米608号 Fukuoka, (JP)</p>		<p>正木恭介(MASAKI, Kyosuke)(JP/JP) 〒830-0027 福岡県久留米市長門石2-2-80-901号 Fukuoka, (JP) 清水精一(SHIMIZU, Seiichi)(JP/JP) 〒841-0051 佐賀県鳥栖市元町1237-2 1001号 Saga, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 三枝英二, 外(SAEGUSA, Eiji et al.) 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜TNKビル Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AU, CA, CN, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: ISOFLAVONE-CONTAINING COMPOSITIONS</p> <p>(54)発明の名称 イソフラボン含有組成物</p> <p>(57) Abstract Compositions, etc., which contain as the essential components a daizein-containing material and a microorganism capable of metabolizing daizein to give equol. These compositions are efficacious in preventing and relieving unidentified complaints in women of middle and old ages, involving climateric symptoms which cannot be efficaciously prevented nor relieved by any conventional means.</p>		

(57)要約

本発明は、ダイゼイン含有物と、ダイゼインを資化してエクオールを産生する能力を有する微生物とを必須成分として含有する組成物等を提供するものであって、該組成物は、従来有効な予防法や緩和手段のなかった更年期障害を含む中高年女性の不定愁訴の予防乃至緩和に有効である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア 共和国	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
CA	カナダ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CC	中央アフリカ	IE	アイルランド	MX	メキシコ	VN	ヴェトナム
CG	コンゴ	IL	イスラエル	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラビア
CH	スイス	IN	インド	NL	オランダ	ZW	ジンバブエ
CI	コートジボワール	IS	アイスランド	NO	ノルウェー		
CM	カメルーン	IT	イタリア	NZ	ニュージーランド		
CN	中国	JP	日本	PL	ポーランド		
CU	キューバ	KE	ケニア	PT	ポルトガル		
CY	キプロス	KG	キルギスタン	RO	ルーマニア		
CZ	チェコ	KP	北朝鮮	RU	ロシア		
DE	ドイツ	KR	韓国	SD	スーダン		
DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	SE	スウェーデン		
EE	エストニア	LC	セントルシア	SG	シンガポール		
ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン				

明 細 書

イソフラボン含有組成物

技 術 分 野

本発明は、イソフラボン含有組成物、より詳しくは、
5 ダイゼイン含有物と、ダイゼインを資化してエクオール
を産生する能力を有する微生物とを配合してなるか又は
上記ダイゼイン含有物に該微生物を作用させて得られる
エクオールを配合してなり、中高年女性における不定愁
訴乃至閉経に伴われる各種症状の予防乃至緩和に有用な
10 新しい組成物に関する。

背 景 技 術

男性の前立腺癌や女性の乳癌、卵巣癌等の性別に特有
の癌が、欧米人と比べて日本人に少ないのは、日本人が
イソフラボン誘導体を含む大豆製品等をより多く摂取し、
15 これによってホルモンのバランスがよく保たれているた
めであるという報告が、国立がんセンターとヘルシンキ
大学（フィンランド）との共同研究によりまとめられて
いる（H. Adlercreutz, et al., (1992) Lancet, 339,
1233; H. Adlercreutz, et al., (1992) Lancet, 342,
20 1209-1210）。

最近では、イソフラボン誘導体がエストロゲン（女性
ホルモン）様作用（A. Molteni, et al., (1995) J.

Nutr., 125, 751S-756S) を有することが注目されており、これがエストロゲンの分泌が低下或いは消失する閉経後の骨粗鬆症 (D. Agnusdei, et al., (1995) Bone and Mineral, 19 (Supple), S43-S48) や更年期障害 (D. D. 5 Baird, et al., (1995) J. Clin. Endocrinol. Metab., 80, 1685-1690; A. L. Murkies, et al., (1995) Maturitas., 21, 195-198) に対して有効であると報告されている。

また、マーガレット ロック (Margaret Lock) の調査 10 (M. Lock, et al., (1988) Maturitas., 10, 317-332) では、日本人女性の更年期症状の出現率は、カナダ女性に較べて非常に低いことが示されている。これを受けて、アドラークロイツ (H. Adlercreutz) らは、日本人女性は豆腐、味噌、醤油等の大豆加工食品を多く摂取しており、 15 之等に含まれている植物エストロゲン (イソフラボン誘導体) が、更年期症状の出現を低くしていると考えている。また彼らは、実際に摂取されたイソフラボン誘導体の吸収量を反映するといわれている尿中排泄量 (24 時間) を比較した結果、日本人女性は欧米人女性に比べて 20 該尿中排泄量が数十倍高いことを報告している (C. Herman, et al., (1995), J. Nutr., 125, 757S-770S)。

以上のように、閉経後の骨粗鬆症や更年期障害等の緩

和や予防には、ダイゼイン、ゲニステイン、ダイジン、ゲニスチン等のイソフラボン誘導体の摂取が、有効であると考えられている。特に、昨今の女性の寿命延長に伴われる閉経後の人生は30年以上になるといわれ、この
5 時期に現われる各種疾患乃至症状の緩和や予防は、QOL（クオリティーオブライフ）の向上につながる点より、重要な課題となっている。

しかしながら、上記報告、即ち、我が国での中高年女性のイソフラボン誘導体の摂取量及び尿中イソフラボン
10 誘導体排泄量の調査報告は、農村部の限られた地域を対称とした報告であり、その実体についての詳細は不明であり、また、更年期障害の出現とイソフラボン誘導体摂取量との関連も殆ど検討はなされておらず、明らかににはされていない。

15 従って、本発明の目的は、従来有効な予防法や緩和手段の確立されていなかった更年期障害を含む中高年女性の不定愁訴の予防乃至緩和に有効な新しい組成物を提供することにある。

本発明者らは、上記目的より、更年期前後の女性を対象として都市部を含む広範囲で食事調査、尿中イソフラ
20 ボン誘導体排泄量の測定、及び更年期症状（不定愁訴）のアンケート調査をまず行なった。

福岡県栄養士会に所属する40～60歳の女性116名を対象に行なった上記調査結果によると、イソフラボン誘導体摂取量は、ダイゼインが平均9 mg / 日、ゲニステインが平均13 mg / 日であった。尿中イソフラボン誘導体排泄量は、ダイゼインが平均19.6 μ mol / 日、ゲニステインが平均10.0 μ mol / 日であり、またダイゼインの代謝物であるエクオールが平均11.9 μ mol / 日（検出者の平均値）であった。尚、上記ダイゼインとゲニステインについては全ての対象者で検出されたが、
10 エクオールは95名中46名（51.6%）にのみ検出された。

また、月経不順と閉経後5年以内のものを更年期者として、更年期障害の診断で使用されてきている17項目
[クッパーマンらの閉経指数(Kupperman H. S., et al.,
15 (1953), J. Clin. Endocrinol. Metabol., 13, 688-703)
を改変した17項目、即ち、1.顔がほてる、2.汗をかきやすい、3.腰や手足がひえる、4.息切れがする、5.手足がしびれる、6.手足の感覚がにぶい、7.夜なかなか寝つかれない、8.夜眠ってもすぐ目を覚ましやすい、9.興奮しやすい、
20 10.神経質である、11.つまらないことにくよくよする、12.めまいや吐き気がある、13.疲れやすい、14.肩こり、腰痛、手足の節々の痛みがある、15.頭が痛

い、16. 心臓の動悸がある、17. 皮膚をアリがはう様な感じがする] について、アンケート調査を行ない、簡易更年期指数 (S M I) を算出した。該 S M I が 20 以上の者を不定愁訴高値群とし、19 以下の者を不定愁訴低値
5 群として、各群に属する更年期者について、イソフラボン誘導体摂取量と尿中イソフラボン誘導体排泄量とを比較した。

その結果、ダイゼイン摂取量については、両群間に差を認めなかったが、ゲニステイン摂取量は、不定愁訴高
10 値群が $p = 0.0643$ で低い傾向にあった。尿中イソフラボン誘導体排泄量では、ダイゼイン及びゲニステイン共に両群間に差を認めなかったが、エクオールの排泄量が不定愁訴高値群で有意に低かった ($p < 0.01$)。

以上の結果より、本発明者らは、更年期女性の不定愁
15 訴がイソフラボン誘導体の中でも特にゲニステインの摂取量及び尿中エクオール排泄量と密接に関連することを見出した。

これまでの知見では、ダイゼインやゲニステイン等のイソフラボン誘導体の種類に関係なく、イソフラボン誘
20 導体全体の摂取量及び尿中排泄量についてのみ、その生理作用との関係が論じられてきたが、本発明者らの日本人中高年女性の調査研究の結果から、単にイソフラボン

誘導体の摂取量及び尿中排泄量だけではなく、ゲニステイン摂取量及び尿中エクオール排泄量、特に更年期女性におけるダイゼインからエクオールへの代謝能が、不定愁訴と密接に関係していることを認めた。

- 5 また、本発明者らが別途に行なった健常成人（25～33歳）を対象とした試験では、イソフラボン誘導体含有食品の代表例である豆乳を単回摂取させた後の尿中イソフラボン誘導体（ダイゼイン及びゲニステイン）排泄量は、用量依存的に増加するが、エクオールが尿中に排泄されない人では、豆乳摂取量を2倍にしてもエクオールは検出されず、ダイゼインからエクオールへの代謝系には個人差のあることが判った。
- 10

- 尚、上記ダイゼインの代謝物であるエクオールは、大豆加工食品等のイソフラボン誘導体を含有する食品中には検出されず、また日常の食生活では食品からは殆ど摂取されないことが知られている（K. Reinli, et al., (1996), Nutr. Cancer, 26, 123-148）。
- 15

- これらの知見をもとに、本発明者らは更に鋭意研究を重ねた結果、ダイゼインを資化してエクオールを産生する能力（代謝活性）を有する微生物と、ダイゼイン又はこれを含む適当な素材とを組合せた新しい組成物、及び上記微生物にてダイゼインを資化させて得られるエクオ
- 20

5

が提供される。

15 物」という)が提供される。

20 から選ばれる少なくとも1種である上記イソフラボン含有組成物及びエクオール含有組成物、特に該微生物が、FERM BP-6435として寄託されたバクテロイ

デス E-23-15 (Bacteroides E-23-15)、FERMBP-6436として寄託されたストレプトコッカス E-23-17 (Streptococcus E-23-17)及びFERMBP-6437として寄託されたストレプトコッカス
5 A6G-225 (Streptococcus A6G-225)からなる群から選ばれる少なくとも1種である上記イソフラボン含有組成物及びエクオール含有組成物が提供される。

本発明によれば、また、上記微生物の維持、増殖成分、例えば乳果オリゴ糖、大豆オリゴ糖、ラクチュロース、
10 ラクチトール及びフラクトオリゴ糖からなる群から選択される少なくとも1種、を更に含有する上記イソフラボン含有組成物及びエクオール含有組成物が提供される。

本発明によれば、上記ダイゼイン含有物が、更にゲニステイン、ダイジン及びゲニスチンからなる群から選ば
15 れる少なくとも1種を含むもの、より好ましくは大豆イソフラボンである上記イソフラボン含有組成物及びエクオール含有組成物が提供される。

本発明によれば、また、中高年女性における不定愁訴乃至閉経に伴われる症状の予防及び処置を行なうための、
20 上記イソフラボン含有組成物及びエクオール含有組成物が提供される。

本発明によれば、また、食品形態が飲料、乳製品、発

酵乳、バー、顆粒、粉末、カプセル及び錠剤形態から選択されるものである上記イソフラボン含有組成物及びエクオール含有組成物が提供される。

- 本発明によれば、また、医薬品形態が水溶液、乳化液、
- 5 顆粒、粉末、カプセル及び錠剤形態から選択されるものである上記イソフラボン含有組成物及びエクオール含有組成物が提供される。

- 本発明によれば、更に、中高年女性における不定愁訴乃至閉経に伴われる症状の予防及び処置を行なう方法であって、該予防及び処置を要求される中高年女性に、
- 10 上記イソフラボン含有組成物又はエクオール含有組成物の有効量を投与する方法が提供される。

- 本発明によれば、更に、中高年女性における不定愁訴乃至閉経に伴われる症状の予防及び処置に有効な上記イ
- 15 ソフラボン含有組成物及びエクオール含有組成物の製造のための、ダイゼイン含有物及びダイゼインを資化してエクオールを産生する能力を有する微生物の使用が提供される。

- 本発明によれば、更に、ダイゼインに、ダイゼインを
- 20 資化してエクオールを産生する能力を有する微生物を作作用させる、エクオールの製造方法も提供される。

本発明によれば、更に、FERM BP-6435と

して寄託されたバクテロイデス E-23-15、
FERM BP-6436として寄託されたストレプト
コッカス E-23-17及びFERM BP-
6437として寄託されたストレプトコッカス A6G
5 -225から選択される微生物も提供される。

以下、本発明イソフラボン含有組成物につき詳述する。

本発明イソフラボン含有組成物においては、一方の必須成分としてダイゼイン含有物を使用する。ここでダイゼイン含有物には、ダイゼイン自体の他、その配糖体であるダイジン及びこれらを含む各種の素材が包含される。
10 上記ダイゼインは、主に大豆、葛等の食素材、その加工品、例えば豆腐、油揚げ、豆乳等、及びその発酵調製物、例えば納豆、醤油、味噌、テンペ等に含まれており、本発明では、之等食素材、その加工品及び発酵調製物を上
15 記ダイゼイン含有物として利用することができる。特に、之等は、ダイゼインの他に、エストロゲン様作用を有する各種のイソフラボン誘導体、例えばゲニステイン、ダイジン、ゲニスチン等や、これらの一部がメチル化された前駆体であるバイオチェインA(Biochain A)、フォル
20 モネチン(Formonetin)等を含有しており、本発明に好適に利用できる。

本発明に好適なダイゼイン含有物には、また大豆由来

の大豆イソフラボン、例えばフジッコ社製「フジフラボン P 1 0」（登録商標）等の市販品や、レッドクローブやアルファルファ等の植物に由来するイソフラボン誘導体が包含される。

- 5 本発明イソフラボン含有組成物においては、他方の必須成分として、ダイゼインを資化してエクオールを産生する能力（代謝活性）を有する微生物を用いる。該微生物には、より詳しくはバクテロイデス・オバタス（*Bacteroides ovatus*）、ストレプトコッカス・インターメディアス（*Streptococcus intermedius*）及びストレプトコッカス・コンステラータス（*Streptococcus constellatus*）に属するものが包含される。之等に属する特に好ましいものとしては、本発明者らがヒト糞便中より新たに単離同定した寄託菌、即ち、バクテロイデス
- 10 E - 2 3 - 1 5（*Bacteroides* E-23-15, FERM BP-6435）、ストレプトコッカス E - 2 3 - 1 7（*Streptococcus* E-23-17, FERM BP-6436）及びストレプトコッカス A 6 G - 2 2 5（*Streptococcus* A6G-225, FERM BP-6437）を例示することができる。
- 15

- 20 以下、之等の微生物の菌学的性質につき詳述する。

（１）バクテロイデス E - 2 3 - 1 5（*Bacteroides* E-23-15, FERM BP-6435）

I. 培地上での発育状態

本菌株は、E G (Eggerth-Gagnon)寒天培地、B L (Blood Liver)寒天培地もしくはG A M培地(Gifu Anaerobic Medium)を用いてスチールウール加嫌気ジャーにより、37℃、48時間、嫌気培養した際に、良好もしくは普通の生育を示す。その集落性状は、正円、凸円状に隆起し、表面、周縁とも平滑～やや粗ざうで、E G寒天培地上では灰白色、B L寒天培地上では灰褐色を呈する。菌形態は、グラム陰性の桿菌で、球桿菌、単桿菌、長桿菌等の多形性を示すが、単在性で連鎖は見られない。本菌株は芽胞を形成しない。

II. 生理学的性質

- (1)至適発育温度：37℃
- (2)至適発育pH：7.0
- 15 (3)ゼラチンの液化：+
- (4)可溶性澱粉の加水分解：+
- (5)エスクリンの加水分解：+
- (6)インドール産生：-
- (7)ウレアーゼ：-
- 20 (8)カタラーゼ：-
- (9)各炭素源の同化性：
L-アラビノース +

13

	D - キシロース	+
	D - グルコース	+
	シュクロース	+
	L - ラムノース	+
5	D - ラフィノース	+
	D - マンニット	+
	インドール	+
	ラクトース	+
	マルトース	+
10	サリシン	+
	ゼラチン	+
	グリセリン	+
	D - セロビオース	+
	D - マンノース	+
15	D - メレチトース	+
	D - ソルビトール	+
	D - トレハロース	+

(10) ペプトン又はグルコース資化後の有機酸組成：

糖資化性用培地である P Y F (ペプトン・イーストエ
20 クストラクトフィールド) 培養液 (約 5 % ペプトン含有)
及び P Y F 培養液にグルコースを終濃度 0. 5 % となる
ように添加したものを用いて、本菌株を嫌氣的条件下で、

37℃、72時間培養することによって得られた培養物中の有機酸をHPLC法によって測定した。結果（単位：mM）を次に示す。

	有機酸	P Y F 培養液	グルコース加 P Y F 培養液
5	マレイン酸	0. 0 2	1. 1 9
	コハク酸	0. 0 1	3. 2 0
	乳酸	0. 0 1	4. 9 4
	蟻酸	0. 0 3	0. 6 6
	酢酸	0. 2 9	2. 6 2
10	ピログルタミン酸	0. 0 1	n d
	プロピオン酸	n d	n d
	i-酪酸	1. 7 1	0. 2 3
	n-酪酸	0. 3 6	n d
	i-吉草酸	n d	0. 1 9
15	n-吉草酸	n d	n d

n d は、検出されずを示す。

以上、菌の形状、生化学的性質、糖資化性及び有機酸
 20 産生の各点から、本菌株は、グラム陰性桿菌であるバク
 テロイデス オバタスあるいはバクテロイデス ユニフ
 ォルミスに分類されるが、ラムノースに対する資化性を
 有することから、バクテロイデス オバタスに属すると

判断された。従って、本発明者は本菌株をバクテロイデ
ス E-23-15 (Bacteroides E-23-15)と命名し、
平成9年7月7日に、工業技術院生命工学工業技術研究
所(日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号)に、微工
5 研菌寄第P-16312号として寄託した。尚、このも
のは、平成10年7月22日に、原寄託よりブダペスト
条約に基づく寄託に移管されており、その受託番号は、
FERM BP-6435である。

(2) ストレプトコッカス E-23-17
10 (Streptococcus E-23-17, FERM BP-6436)

I. 培地上での発育状態

本菌株は、EG寒天培地、BL寒天培地もしくは
GAM培地を用いてスチールウール加嫌気ジャーにより、
37℃、48時間、嫌気培養した際に、良好もしくは普
15 通の生育を示す。その集落性状は、正円、円錐～中心凸
状も隆起し、すりガラス状～顆粒状構造で、周縁平滑～
やや粗を示す。EG寒天培地上では透明～灰褐色を呈す
る。菌形態は、グラム陽性の球菌で、楕円形又は両端が
やや尖った形をとる。単在もしくは双球状で不規則にか
20 たまった集団を形成する。連鎖は見られない。芽胞は形
成しない。

II. 生理学的性質

16

- (1)至適発育温度：37℃
(2)至適発育pH：7.0
(3)ゼラチンの液化：－
(4)可溶性澱粉の加水分解：－
5 (5)エスクリンの加水分解：＋
(6)インドール産生：－
(7)ウレアーゼ：－
(8)カタラーゼ：－
(9)各炭素源の同化性：
- | | | |
|----|----------|---|
| 10 | L－アラビノース | ＋ |
| | D－キシロース | － |
| | D－グルコース | ＋ |
| | シュクロース | － |
| | L－ラムノース | ＋ |
| 15 | D－ラフィノース | － |
| | D－マンニット | ＋ |
| | インドール | － |
| | ラクトース | ＋ |
| | マルトース | ＋ |
| 20 | サリシン | ＋ |
| | ゼラチン | － |
| | グリセリン | － |

17

	D - セロビオース	+
	D - マンノース	+
	D - メレチトース	-
	D - ソルビトール	±
5	D - トレハロース	+

(10) ペプトン又はグルコース資化後の有機酸組成：

糖資化性用培地である P Y F (ペプトン・イーストエキストラクトフィールド) 培養液 (約 5 % ペプトン含有) 及び P Y F 培養液にグルコースを終濃度 0. 5 % となる
10 ように添加したものを用いて、本菌株を嫌氣的条件下で、
37℃、72時間培養を行なうことによって得られた培養物中の有機酸を H P L C 法によって測定した。結果
(単位：m M) を次に示す。

15

20

	有機酸	P Y F 培養液			グルコース加 P Y F 培養液		
		P	Y	F	P	Y	F
5	マレイン酸	0.	0	4		n	d
	コハク酸	2.	3	7	0.	0	2
	乳酸	0.	0	2		n	d
	蟻酸	0.	0	3	0.	0	3
	酢酸	3.	3	2	0.	0	7
10	ピログルタミン酸	0.	0	3		n	d
	プロピオン酸	3.	2	4		n	d
	i-酪酸	4.	1	7	1.	1	1
	n-酪酸			n		n	d
	i-吉草酸	4.	5	0		n	d
	<u>n-吉草酸</u>			<u>n</u>		<u>n</u>	<u>d</u>

n d は、検出されずを示す。

- 15 以上、菌の形状、生化学的性質、糖資化性及び有機酸
 産生の各点から、本菌株は、グラム陽性球菌であるルミ
 ノコッカス プロダクタスあるいはストレプトコッカス
 コンステラタスに分類されるが、ルミノコッカス プ
 ロダクタスの基準株とは、シュクロース、D-キシロー
 20 ス、D-ラフィノースの同化性の点で異なっている。従
 って、本発明者は本菌株をストレプトコッカス E-
 23-17 (Streptococcus E-23-17)と命名し、平成9

年 7 月 7 日に、工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号）に、微工研菌寄第 P - 1 6 3 1 3 号として寄託した。尚、このものは、平成 1 0 年 7 月 2 2 日に、原寄託よりブダペスト条約に
5 基づく寄託に移管されており、その受託番号は、FERM BP-6436である。

（ 3 ） ストレプトコッカス A 6 G - 2 2 5

（Streptococcus A6G-225, FERM BP-6437）

I. 培地上での発育状態

10 本菌株は、E G 寒天培地、B L 寒天培地もしくは
G A M 培地を用いてスチールウール加嫌気ジャーにより、
3 7 °C、4 8 時間、嫌気培養した際に、良好もしくは普通
の生育を示す。その集落性状は、正円、円錐～中心凸
状も隆起し、すりガラス状～顆粒状構造で、周縁平滑～
15 やや粗を示す。E G 寒天培地上では透明～灰白色を呈す
る。菌形態は、グラム陽性の球菌で、楕円形又は両端が
やや尖った形をとる。単在もしくは双球状で不規則にか
たまった集団を形成する。連鎖は見られない。芽胞は形
成しない。

20 II. 生理学的性質

（1）至適発育温度：3 7 °C

（2）至適発育 p H：7. 0

- (3)ゼラチンの液化：－
- (4)可溶性澱粉の加水分解：－
- (5)エスクリンの加水分解：＋
- (6)インドール産生：－
- 5 (7)ウレアーゼ：－
- (8)カタラーゼ：－
- (9)各炭素源の同化性：
- | | | |
|----|----------|---|
| | L－アラビノース | － |
| | D－キシロース | － |
| 10 | D－グルコース | ＋ |
| | シュクロース | ＋ |
| | L－ラムノース | － |
| | D－ラフィノース | ＋ |
| | D－マンニット | － |
| 15 | インドール | － |
| | ラクトース | ＋ |
| | マルトース | ＋ |
| | サリシン | ＋ |
| | ゼラチン | － |
| 20 | グリセリン | － |
| | D－セロビオース | ＋ |
| | D－マンノース | ＋ |

21

D - メレチトース	-
D - ソルビトール	-
D - トレハロース	-

(10) ペプトン又はグルコース資化後の有機酸組成：

- 5 糖資化性用培地である P Y F (ペプトン・イーストエ
クストラクトフィールド) 培養液 (約 5 % ペプトン含有)
及び P Y F 培養液にグルコースを終濃度 0. 5 % となる
ように添加したものをを用いて、本菌株を嫌氣的条件下で、
3 7 °C、7 2 時間培養を行なうことによって得られた培
10 養物中の有機酸を H P L C 法によって測定した。結果
(単位 : m M) を次に示す。

	<u>有機酸</u>	<u>P Y F 培養液</u>			<u>グルコース加 P Y F 培養液</u>		
		P	Y	F	P	Y	F
5	マレイン酸		n	d		n	d
	コハク酸	0.	2	1	0.	0	3
	乳酸		n	d	3	5.	3
	蟻酸	0.	5	5	1.	6	6
	酢酸	1.	3	5	0.	5	4
10	ピログルタミン酸		n	d		n	d
	プロピオン酸		n	d		n	d
	i-酪酸	2.	0	4		n	d
	n-酪酸		n	d		n	d
	i-吉草酸		n	d		n	d
	<u>n-吉草酸</u>		<u>n</u>	<u>d</u>		<u>n</u>	<u>d</u>

n d は、検出されずを示す。

- 15 以上、菌の形状、生化学的性質、糖資化性及び有機酸
 産生の各点から、本菌株は、グラム陽性球菌であるスト
 レプトコッカス インターメディアスに分類されるが、
 その基準株とは、L-ラムノース、D-トレハロースの
 同化性の点で異なっている。従って、本発明者は本菌株
 20 をストレプトコッカス A 6 G - 2 2 5

(Streptococcus A6G-225)と命名し、平成9年7月7日
 に、工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県

つくば市東1丁目1番3号)に、微工研菌寄第P-16314号として寄託した。尚、このものは、平成10年7月22日に、原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託に移管されており、その受託番号は、FERM BP-5 6437である。

本発明者が独自に単離した上記3種の微生物は、いずれも、ダイゼインを資化してエクオールを産生する能力を有することをその最大の特徴としている。ここで、ダイゼインには、例えばダイジン等のイソフラボン配糖体のアグリコンとしてのダイゼインも包含される。該ダイジン10 は上記微生物により資化されて、ダイゼインが産生され、更に該ダイゼインからエクオールが産生される。

従来、かかるエクオール産生能を有する微生物は報告された例がない。従って、本発明はかかるエクオール産15 生能を有する新しい微生物をも提供するものである。

本発明イソフラボン含有組成物の必須成分とする上記微生物は、各微生物の生菌そのものであるのが一般的であるが、特にこれに限定されず、例えばその培養液、培養物の粗精製品乃至精製品、それらの凍結乾燥品等であ20 ってもよい。その配合量は微生物の種類等に応じて適宜決定でき、特に限定されるものではない。例えば牛乳を発酵させた場合のストレプトコッカス・インターメディ

アス菌の場合は、菌数が $10^8 \sim 10^9$ 個/ml前後となる量に調整されるのが好適である。該菌数の測定は、菌培養用の寒天培地に希釈した試料を塗布して 37°C 下、嫌気培養を行ない、生育したコロニー数を計測すること
5 により算出したものである。他の菌株の場合も上記菌数を目安として適宜決定できる。

本発明イソフラボン含有組成物中には、更に好ましくは、上記微生物の維持、増殖に特に適した栄養成分を含有させることができる。該栄養成分としては、例えば乳
10 果オリゴ糖、大豆オリゴ糖、ラクチュロース、ラクチトール、フラクトオリゴ糖、ガラクトオリゴ糖等の各種オリゴ糖を例示できる。これらの配合量は、特に限定されるものではないが、通常本発明組成物中に1～3重量%程度となる量範囲から選ばれるのが好ましい。

15 本発明組成物は、一般には上記必須成分及びその他の成分の所定量を混合して、摂取乃至投与に適した適当な食品乃至医薬品形態、例えば食品形態の場合は、飲料、乳製品、発酵乳、バー、顆粒、粉末、カプセル、錠剤等の形態、医薬品の場合は、水溶液、乳化液、顆粒、粉末、
20 カプセル、錠剤等の形態にそれぞれ調製される。これら各形態への調製は、常法に従うことができる。またこれら各形態への調製に当たって用いられる担体は、可食性

担体乃至製剤学的に許容される賦形剤や希釈剤等の担体のいずれでもよい。特に食品形態の場合は、口当たりのよい味覚改善効果のある担体が好ましい。

特に使用の好ましい担体としては、例えばマスキング
5 剤であるトレハロース（林原社製）、サイクロデキストリン、ベネコートB M I（花王社製）等を例示できる。

また、本発明組成物における上記ダイゼイン含有物、特定微生物及び必要に応じて添加配合される微生物の維持、増殖成分の混合比率は、特に限定的ではないが、
10 一般に、本発明組成物100gに対して、ダイゼイン含有物ではダイゼインが約10～50mgの範囲内とするのが好ましい。また、微生物は、同組成物に対して $10^9 \sim 10^{10}$ 個（生菌数として）、オリゴ糖は同組成物に対して約1～5gの範囲内であるのが望ましい。

15 尚、上記の通り、本発明イソフラボン含有組成物は、微生物（主に生菌）を含有させるものであるため、該組成物の製品化に当たっては、加熱、加圧等の条件の採用はあまり好ましくない。従って、本発明組成物を例えば
20 ば、顆粒、粉末、錠剤等の製品形態に調整するに当たっては、微生物を凍結乾燥菌体として直接処方するか、凍結乾燥菌体を適当なコーティング剤で加工して用いるのが好ましい。

本発明組成物には、必要に応じて、更に各種の栄養補給効果を奏し得る他の食素材や医薬品の調製に当たって慣用される各種の添加剤等を適宜添加配合することができる。該食素材としては、例えばカルシウム、ビタミン

5 B、ビタミンD、ビタミンC、ビタミンE、ビタミンK（特に納豆菌由来のMK-7（menaquinone-7））等を例示できる。他の添加できる素材の例としては、例えば亜鉛、セレン等を例示できる。

かくして得られる本発明イソフラボン含有組成物は、

10 中高年女性における不定愁訴乃至閉経に伴われる、例えば骨粗鬆症、更年期障害等の症状の予防及び処置に有用である。かかる、予防及び処置は、これを要求される中高年女性に、上記本発明組成物の有効量を投与するか又は摂取させることにより実施される。該有効量は、本発

15 明組成物の投与によって、中高年女性における不定愁訴乃至閉経に伴われる、例えば骨粗鬆症、更年期障害等の症状の予防及び処置が可能である限り、特に限定されるものではないが、一般には、ダイゼインが約10～50mg／日、ゲニステインが約10mg／日以上摂取され

20 る量とするのが好ましい。

次いで、本発明エクオール含有組成物につき以下に詳述する。

本発明エクオール含有組成物は、ダイゼインを資化してエクオールを産生する能力を有する微生物をダイゼイン含有物に作用させて得られるエクオールを有効成分として含有することを必須とする。

5 ここで微生物としては、前述した本発明イソフラボン含有組成物において必須成分とするそれと同一のものを挙げるができる。また、該微生物を作用させるダイゼイン含有物も、前述した本発明イソフラボン含有組成物における場合と同様に、単離精製されたダイゼイン及
10 びこれを含む食素材、その加工品もしくは発酵調製物、例えば大豆イソフラボン、葛、レッドクローブ、アルファルファ等に由来するイソフラボンやこれらを含む製品、例えば豆腐、豆乳、煮大豆、納豆、大豆胚軸抽出物等であることができる。

15 本発明エクオール含有組成物は、その有効成分とするエクオールが上記の通り天然物であることから、安全性に優れており、また微生物を用いて調製されたものであることに基づいて、その製造工程に由来する化学薬品等の混入のおそれもなく、更に高収率で且つ低生産コスト
20 である利点がある。

本発明エクオール含有組成物は、上記ダイゼイン含有物、好ましくは大豆イソフラボン又はこれを含む食

素材を基質として利用して、一般的な発酵方法に従い、上記微生物を培養することによって調製できる。

この方法は、より詳しくは、例えば基質を溶液状態にして滅菌した後、これに所定の微生物を添加して、37℃下に、嫌気状態あるいは好氣的静置状態で、48～96時間程度発酵（必要に応じてpH調節剤、還元物質（例えば酵母エキス、ビタミンK₁等）を添加できる）させることにより実施できる。

上記培養は、例えばストレプトコッカス インターメディアス菌の場合は、より好ましくは次の如くして実施できる。即ち、嫌気性菌増殖用の変法GAM培地（Modified Gifu Anaerobic Medium）に、基質としてダイゼインを0.01～0.5mg/mlの範囲で溶解する。予め、変法GAM培地で14時間程度前培養して増殖させた微生物の培養液を、ダイゼインを溶解させた変法GAM培地に接種する。接種量は培地の1/100容量とする。好氣的条件下に、37℃で、48～96時間静置培養する。

本発明は、かかる微生物を利用したエクオールの製造方法をも提供するものである。

上記発酵系内には、更に好ましくは上記微生物の維持、増殖に特に適した栄養成分を含有させることができる。

該栄養成分としては、例えば乳果オリゴ糖、大豆オリゴ糖、ラクチュロース、ラクチトール、フラクトオリゴ糖、ガラクトオリゴ糖等のオリゴ糖を例示できる。これらの配合量は、特に限定されるものではないが、通常本発明
5 組成物中に1～3重量%程度配合される量範囲から選ばれるのが好ましい。

かくして、所望のエクオール含有培養物が得られる。

該培養物からのエクオールの単離精製は、常法に従うことができる。例えば得られた発酵培養物をイオン交換
10 樹脂（DIAION HP20，三菱化成社製）に吸着させた後、メタノールで溶出させ、乾固して、エクオール粗精製物とすることができる。

本発明のエクオール含有組成物は、上記の如くして得られるエクオール含有培養物又は単離されたエクオール
15 を利用して、これを更に必要に応じて適当な他の食素材等を適宜配合して、適当な食品形態乃至医薬品形態に調製することができる。

上記食品形態としては、例えば飲料、乳製品、発酵乳、バー、顆粒、粉末、カプセル、錠剤等を例示できる。また、医薬品形態としては、例えば水溶液、乳化液、顆粒、
20 粉末、カプセル、錠剤等の形態を例示できる。これら各形態への調製は、常法に従うことができる。またこれら

各形態への調製に当たって用いられる担体は、可食性担体乃至製剤学的に許容される賦形剤や希釈剤等の担体のいずれでもよい。特に食品形態の場合は、口当たりのよい味覚改善効果のある担体が好ましい。

- 5 かくして得られる本発明組成物中のエクオール量は、調製される食品形態及び医薬品形態に応じて決定され、特に限定されるものではないが、通常組成物全100g中にエクオールが10～50mg程度含有される量の範囲とするのが好ましい。
- 10 本発明組成物の摂取量は、特に限定されるものではないが、摂取した場合に尿中のエクオール排泄量が5μM／日以上となる量を目安とすることができる。
- 本発明エクオール含有組成物は、中高年女性における不定愁訴乃至閉経に伴われる、例えば鬆症、更年期障害
- 15 等の症状の予防及び処置に有用である。

発明を実施するための最良の形態

- 以下、本発明を更に詳しく説明するため本発明イソフラボン含有組成物の調製例、エクオール含有組成物の調製例、エクオールの製造例を実施例として挙げるが、本
- 20 発明はこれに限定されるものではない。

実施例1 飲料の調製

 下記処方各成分を秤量混合して、飲料形態の本発明

組成物を調製した。

	水溶性大豆蛋白の発酵培養物	1 0 m l
	乳果オリゴ糖 (5 5 % 含量)	1 0 . 0 g
	ビタミン・ミネラル	適量
5	香料	適量
	水	適量
	全量	1 5 0 m l

上記水溶性大豆蛋白の発酵培養物は、水溶性大豆蛋白
2 . 2 g を水 1 0 m l に溶解したものに、ストレプトコ
10 ッカス A 6 G - 2 2 5 (F E R M B P - 6 4 3 7)
を 10^8 個加えて、3 7 °C で 4 8 時間発酵させたものであ
る。

実施例 2 発酵乳の調製

下記処方各成分を秤量混合して、発酵乳形態の本発
15 明イソフラボン含有組成物を調製した。

	水溶性大豆蛋白	2 . 2 g
	乳果オリゴ糖 (5 5 % 含量)	1 . 0 . 0 g
	ストレプトコッカス A 6 G - 2 2 5 発酵乳	1 0 0 m l
	ビタミン・ミネラル	適量
20	香料	適量
	水	適量
	全量	5 0 m l

尚、水溶性大豆蛋白中には、ダイゼインが3～4%程度（高速液体クロマトグラフィー分析による、以下同じ）含まれる。また、ストレプトコッカスA6G-225発酵乳は、牛乳1リットルにストレプトコッカスA6G-225（FERM BP-6437）を 10^8 個を加え、37℃で24時間発酵させたものである。

実施例3 発酵豆乳凍結乾燥粉末の調製

ストレプトコッカスA6G-225（FERM BP-6437）約 10^7 個/mlの1mlを用いて、豆乳100gを37℃で24時間乳酸発酵させて、エクオールを生成させた。これを凍結乾燥して粉末とした。粉末中のエクオール含量は、0.1～0.3重量%であった。

上記粉末を用いて、下記処方各成分を秤量混合して、発酵豆乳凍結乾燥粉末形態の本発明組成物を調製した。

15	発酵豆乳凍結乾燥粉末	2.2g
	賦形剤	適量
	ビタミン・ミネラル	適量
	香料	適量
	全量	20g

20 尚、賦形剤としては、コーンスターチ17gを用いた。

実施例4 粉末の調製

下記処方各成分を秤量混合して、粉末形態の本発明

組成物を調製した。

	粗精製大豆イソフラボン末	4. 1 g
	乳果オリゴ糖（55%含量）	10. 0 g
	ストレプトコッカスE-23-17凍結乾燥粉末	
5		1. 0 g
	ビタミン・ミネラル	適量
	香料	適量
	全量	20 g

- 尚、ストレプトコッカスE-23-17凍結乾燥粉末
 10 は、ストレプトコッカスE-23-17（FERM
 BP-6436）を増殖可能な適当な液体培地（GAMBROS）で培養（37℃、24～48時間）した後、集
 菌したものを凍結乾燥することによって得られたもので
 あり、その菌体含量は $10^9 \sim 10^{10}$ 個/gである。

15 実施例5 顆粒の調製

下記処方各成分を秤量混合して、顆粒形態の本発明組成物を調製した。

	粗精製大豆イソフラボン末	4. 1 g
	乳果オリゴ糖（55%含量）	10. 0 g
20	ストレプトコッカスE-23-17凍結乾燥粉末	
		1. 0 g
	ソルビトール	適量

ビタミン・ミネラル	適量
香料	適量
全量	20 g

尚、ストレプトコッカス E-23-17 凍結乾燥粉末
 5 としては、実施例 4 と同一のものを用了。

実施例 6 (微生物によるエクオール製造)

基質として水溶性大豆イソフラボン素材 (フジッコ社
 製「フジフラボン P10」) を用いて、その 2.2% 濃
 度水溶液中に、ストレプトコッカス A6G-225
 10 (FERM BP-6437) の $10^7 \sim 10^9$ 菌数を
 嫌気性菌培養用の GAM 培地に懸濁させた液 1 ml を加
 え、好氣的、37℃、静置条件下で 96 時間、培養し、
 培養液中に産生するエクオール量を HPLC 法により測
 定した。尚、上記水溶液のダイジン濃度は 1.083
 15 mg/ml であり、ダイゼイン濃度は 0.014 mg/
 ml であった。

その結果、水溶性大豆イソフラボン素材中には、エク
 オールは検出されなかったのに対して、96 時間培養後
 の培養液中のエクオール含量は、 613.0 ± 8.7
 20 $\mu\text{g/ml}$ (5 回の平均値 \pm 標準偏差) であり、ダイジ
 ン及びダイゼインは検出されなかった。

尚、上記において水溶性大豆イソフラボンに代えてダ

イゼイン（フナコシ社製、純度 99% 以上）0.01
 mg/ml を含む基質液（ダイゼイン 5 mg を特級メタ
 ノール 2 ml に懸濁させ、これを BHI（ブレインハー
 トインフュージョン）培地で 50 ml に希釈したもの）
 5 を用いて、同様にしてエクオールを製造した結果、96
 時間後の培養液中のエクオール含量は、 $17.9 \pm$
 $1.4 \mu\text{g/ml}$ （5 回の平均値 \pm 標準偏差）であった。

このことから、本発明微生物の利用によれば、ダイゼ
 インからエクオールを効率よく製造できることが明らか
 10 である。

実施例 7 飲料の調製

エクオール含有発酵培養物	1.55 g
ブドウ糖	5.00 g
クエン酸	0.5 g
15 ビタミン・ミネラル	適量
香料	適量
水	適量
全量	200 ml

実施例 6 と同様にして、水溶性大豆イソフラボン素材
 20 （フジフラボン P10、フジッコ社製）の 2.2% 濃度
 水溶液に、ストレプトコッカス A6G-225
 （FERM BP-6437）の $10^7 \sim 10^9$ 菌数を嫌

気性菌培養用のGAM培地に懸濁させた液1mlを加え、好氣的、37℃、静置条件下で96時間培養して得られたエクオール含有発酵培養物を用いて、上記処方に従い、飲料形態本発明組成物を調製した。

5 実施例8 バーの調製

エクオール含有発酵培養物	1. 55 g
バター	20. 0 g
砂糖	20. 0 g
塩	少々
10 卵	1 / 2 個
小麦粉	80. 0 g
ビタミン・ミネラル	適量
香料	適量
牛乳	30. 0 g

- 15 実施例7に記載のエクオール含有発酵培養物を用いて、上記処方に従い、生地を調製し、これを適当なバー状形態に賦形後、170℃のオーブンで15分間焼いて、菓子バーを調製した。

実施例9 ゼリーの調製

20 エクオール含有発酵培養物	1. 55 g
果汁	50. 0 g
砂糖	50. 0 g

寒天	2. 5 g
ビタミン・ミネラル	適量
香料	適量

- 実施例 7 に記載のエクオール含有発酵培養物を用いて、
- 5 上記処方に従い、各成分を混合しながら、90℃まで加熱して、寒天を溶かし、全体を適当な容器に流し込んだ後、5～10℃に冷却して凝固させて、ゼリー状形態の本発明組成物を調製した。

産業上の利用可能性

- 10 本発明組成物は、食品形態乃至医薬品形態でこれを摂取乃至投与することによって、中高年女性における不定愁訴乃至閉経に伴われる各種症状の予防乃至緩和に有用である。

請 求 の 範 囲

- 1 ダイゼイン含有物と、ダイゼインを資化してエクオールを産生する能力を有する微生物とを必須成分として含有することを特徴とする組成物。
- 5 2 ダイゼインを資化してエクオールを産生する能力を有する微生物が、バクテロイデス・オバタス、ストレプトコッカス・インターメディアス及びストレプトコッカス・コンステラータスからなる群から選ばれる少なくとも1種である請求項1に記載の組成物。
- 10 3 ダイゼインを資化してエクオールを産生する能力を有する微生物が、FERM BP-6435号として寄託されたバクテロイデス E-23-15、
FERM BP-6436号として寄託されたストレプトコッカス E-23-17及びFERM BP-
15 6437号として寄託されたストレプトコッカス
A6G-225からなる群から選ばれる少なくとも1種である請求項1に記載の組成物。
- 4 ダイゼインを資化してエクオールを産生する能力を有する微生物の維持、増殖成分を更に含有する請求項
20 1に記載の組成物。
- 5 ダイゼインを資化してエクオールを産生する能力を有する微生物の維持、増殖成分が、乳果オリゴ糖、大

豆オリゴ糖、ラクチュロース、ラクチトール及びフラクトオリゴ糖からなる群から選択される少なくとも1種である請求項4に記載の組成物。

6 ダイゼイン含有物が、更にゲニステイン、ダイジン
5 及びゲニスチンを含むものである請求項1に記載の組成物。

7 ダイゼイン含有物が大豆イソフラボンである請求項1に記載の組成物。

8 中高年女性における不定愁訴乃至閉経に伴われる症
10 状の予防及び処置を行なうための、請求項1に記載の組成物。

9 食品形態である請求項8に記載の組成物。

10 食品形態が飲料、乳製品、発酵乳、バー、顆粒、粉末、カプセル及び錠剤形態から選択されるものである請求項
15 9に記載の組成物。

11 医薬品形態である請求項8に記載の組成物。

12 医薬品形態が水溶液、乳化液、顆粒、粉末、カプセル及び錠剤形態から選択されるものである請求項
11 1に記載の組成物。

20 13 中高年女性における不定愁訴乃至閉経に伴われる症状の予防及び処置を行なう方法であって、請求項1に記載の組成物の有効量を上記予防及び処置を要求さ

れる中高年女性に投与する方法。

- 1 4 中高年女性における不定愁訴乃至閉経に伴われる
症状の予防及び処置に有効な組成物の製造のための、
ダイゼイン含有物及びダイゼインを資化してエクオール
5 ルを産生する能力を有する微生物の使用。
- 1 5 ダイゼインを資化してエクオールを産生する能力
を有する微生物をダイゼイン含有物に作用させて得ら
れるエクオールを必須成分として含有することを特徴
とする組成物。
- 10 1 6 ダイゼインを資化してエクオールを産生する能力
を有する微生物が、バクテロイデス・オバタス、スト
レプトコッカス・インターメディアス及びストレプト
コッカス・コンステラータスからなる群から選ばれる
少なくとも1種である請求項15に記載の組成物。
- 15 1 7 ダイゼインを資化してエクオールを産生する能力
を有する微生物が、FERM BP-6435号とし
て寄託されたバクテロイデス E-23-15、
FERM BP-6436号として寄託されたストレ
プトコッカス E-23-17及びFERM BP-
20 6437号として寄託されたストレプトコッカス
A6G-225からなる群から選ばれる少なくとも1
種である請求項15に記載の組成物。

- 1 8 ダイゼインを資化してエクオールを産生する能力
 を有する微生物の維持、増殖成分を更に含有する請求
 項 1 5 に記載の組成物。
- 1 9 ダイゼインを資化してエクオールを産生する能力
5 を有する微生物の維持、増殖成分が、乳果オリゴ糖、
 大豆オリゴ糖、ラクチュロース、ラクチトール及びフ
 ラクトオリゴ糖からなる群から選択される少なくとも
 1 種である請求項 1 5 に記載の組成物。
- 2 0 ダイゼイン含有物が、更にゲニステイン、ダイジ
10 ン及びゲニスチンを含むものである請求項 1 5 に記載
 の組成物。
- 2 1 ダイゼイン含有物が大豆イソフラボンである請求
 項 1 5 に記載の組成物。
- 2 2 中高年女性における不定愁訴乃至閉経に伴われる
15 症状の予防及び処置を行なうための、請求項 1 5 に記
 載の組成物。
- 2 3 食品形態である請求項 2 2 に記載の組成物。
- 2 4 食品形態が飲料、乳製品、発酵乳、バー、顆粒、
 粉末、カプセル及び錠剤形態から選択されるものであ
20 る請求項 2 3 に記載の組成物。
- 2 5 医薬品形態である請求項 2 2 に記載の組成物。
- 2 6 医薬品形態が水溶液、乳化液、顆粒、粉末、カプ

セル及び錠剤形態から選択されるものである請求項
25に記載の組成物。

27 中高年女性における不定愁訴乃至閉経に伴われる
症状の予防及び処置を行なう方法であって、請求項

5 15に記載の組成物の有効量を上記予防及び処置を要
求される中高年女性に投与する方法。

28 中高年女性における不定愁訴乃至閉経に伴われる
症状の予防及び処置に有効な組成物の製造のための、
ダイゼイン含有物及びダイゼインを資化してエクオール
10 を産生する能力を有する微生物の使用。

29 ダイゼインに、ダイゼインを資化してエクオール
を産生する能力を有する微生物を作用させることを特
徴とするエクオールの製造方法。

30 ダイゼインを資化してエクオールを産生する能力
15 を有する微生物が、バクテロイデス・オバタス、スト
レプトコッカス・インターメディアス及びストレプト
コッカス・コンステラータスからなる群から選ばれる
少なくとも1種である請求項29に記載の方法。

31 ダイゼインを資化してエクオールを産生する能力
20 を有する微生物が、FERM BP-6435号とし
て寄託されたバクテロイデス E-23-15、
FERM BP-6436号として寄託されたストレ

プトコッカス E-23-17 及び FERM BP-6437 号として寄託されたストレプトコッカス A6G-225 からなる群から選ばれるものである請求項 29 に記載の方法。

- 5 32 FERM BP-6435 号として寄託されたバクテロイデス E-23-15、FERM BP-6436 号として寄託されたストレプトコッカス E-23-17 及び FERM BP-6437 号として寄託されたストレプトコッカス A6G-225 から
10 選択される微生物。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/03460

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ A61K35/74, 35/78, A23L1/30, C12N1/20 // A61K31/35, C07D311/36

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ A61K35/74, 35/78, 31/35, A23L1/30, C12N1/20

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 59-199630, A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 12 November, 1984 (12. 11. 84) & DE, 3415394, A	1-12, 14-26, 28-32
A	JP, 5-176711, A (Kyodo Nyugyo K.K.), 20 July, 1993 (20. 07. 93) (Family: none)	1-12, 14-26, 28-32
A	JP, 4-356479, A (Kuraray Co., Ltd.), 10 December, 1992 (10. 12. 92) (Family: none)	1-12, 14-26, 28-32
A	JP, 9-157268, A (Nippon Kayaku Co., Ltd.), 17 June, 1997 (17. 06. 97) (Family: none)	1-12, 14-26, 28-32

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
16 November, 1998 (16. 11. 98)Date of mailing of the international search report
24 November, 1998 (24. 11. 98)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/03460

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 13, 27
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
They pertain to methods for treatment of the human body by therapy.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ A61K35/74, 35/78, A23L1/30, C12N1/20//A61K31/35, C07D311/36

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ A61K35/74, 35/78, 31/35, A23L1/30, C12N1/20

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	J P, 59-199630, A (武田薬品工業株式会社) 12. 1 1月. 1984 (12. 11. 84) & DE, 3415394, A	1-12, 14-26, 28-32
A	J P, 5-176711, A (協同乳業株式会社) 20. 7月. 1 993 (20. 07. 93) (ファミリーなし)	1-12, 14-26, 28-32
A	J P, 4-356479, A (株式会社クラレ) 10. 12月. 1 992 (10. 12. 92) (ファミリーなし)	1-12, 14-26, 28-32
A	J P, 9-157268, A (日本化薬株式会社) 17. 6月. 1 997 (17. 06. 97) (ファミリーなし)	1-12, 14-26, 28-32

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16. 11. 98

国際調査報告の発送日

24.11.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内田 淳子



4 C

8115

電話番号 03-3581-1101 内線 3454

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 13, 27 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
人の身体の治療による処置方法である。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとその国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

ISOFLAVONE-CONTAINING COMPOSITION

TECHNICAL FIELD

The present invention relates to an isoflavone-containing
5 composition and more particularly to a novel composition either
comprising a daidzein-containing substance and a strain of
microorganism capable of metabolizing daidzein to equol or
comprising equol obtained by causing said strain of microorganism
to act upon said daidzein-containing substance, which
10 composition is useful for the prevention and alleviation of
unidentified clinical syndrome and conditions associated with
the menopause in middle-aged to elderly women.

BACKGROUND ART

The documented collaborative research of National
15 Cancer Center of Japan and Helsinki University (Finland)
attributes the low incidence of gender-specific neoplastic
diseases such as carcinoma of the prostate in men and
carcinoma of the breast or ovary in women among the Japanese
as compared with the European and American people to the
20 greater intake by the Japanese of soybean-derived foods
containing various isoflavonoids and the consequent
well-coordinated balance of hormones (H. Adlercreutz, et
al., (1992) Lancet, 339, 1233; H. Adlercreutz, et al., (1992)
Lancet, 342, 1209-1210).

25 Recently, there has been a mounting interest in the

fact that isoflavonoids have estrogen (female hormone)-like activity (A. Molteni, et al., (1995) J. Nutr., 125, 751S-756S), and it has been reported that these compounds are effective in osteoporosis which develops after the
 5 menopause when estrogen secretions have subsided or ceased (D. Agnusdei, et al., (1995) Bone and Mineral, 19 (Supple), S43-S48) as well as in menopausal syndrome (D. D. Baird, et al., (1995) J. Clin. Endocrinol, Metab., 80, 1685-1690; A. L. Murkies, et al., (1995) Maturitas., 21, 195-198).

10 According to the result of a survey undertaken by Margaret Lock (M. Lock, et al., (1988) Maturitas., 10, 317-332), the incidence of menopausal syndrome among the Japanese women is extremely low as compared with the Canadian counterparts. Based on the report, H.

15 Adlercreutz and coworkers conjecture that the Japanese women ingest large amounts of processed soybean foods such as tofu, miso, soy sauce, etc. and, hence, the plant estrogens (isoflavonoids) occurring in those foods are responsible for the low incidence of menopausal syndrome. Comparing
 20 the urinary excretions (24-hour urine) which are known to reflect the amount of absorption of isoflavonoids actually ingested, the same authors further report that compared with the Western women, the urinary excretions in the Japanese women are tens of times as high (C. Herman, et
 25 al., (1995), J. Nutr., 125, 757S-770S).

It is, thus, considered that the intake of isoflavonoids such as daidzein, genistein, daidzin, genistin, etc. is effective for the alleviation and prevention of postmenopausal osteoporosis and menopausal syndrome. Particularly, the postmenopausal life expectancy in women has reportedly increased to more than 30 years owing to the recent trend toward longevity and the alleviation and prevention of various diseases and symptoms which may develop after the menopause have important meanings in that they would lead to improvements in quality of life (QOL).

However, the above report, i.e. the survey report on the amount of intake of isoflavonoids and the urinary excretions of isoflavonoids in the middle-aged to elderly women in Japan reflects the results generated in a limited rural area and no substantive information is available. Moreover, the correlation between the frequency of menopausal syndrome and the amount of intake of isoflavonoids has not been squarely analyzed and revealed.

Therefore, the object of the present invention is to provide a novel composition which is effective for the prevention and alleviation of the so-called unidentified clinical syndrome in middle-aged to elderly women, inclusive of menopausal syndrome, for which no effective means of prevention or alleviation has been available.

To accomplish the above object, the inventors first conducted a dietary survey, determination of urinary excretions of isoflavonoids, and a questionnaire survey about menopausal syndrome (unidentified clinical syndrome) in perimenopausal women in a broad geographical area including urban communities.

According to the results of the above investigation conducted in 116 women aged between 40 and 60 who belonged to Fukuoka Dietitian Association, the average amounts of intake of isoflavonoids were 9 mg/day for daidzein and 13 mg/day for genistein. The average urinary excretions of isoflavonoids were 19.6 μ mol/day for daidzein and 10.0 μ mol/day for genistein, and the average excretions of equol, a metabolite of daidzein, was 11.9 μ mol/day (mean of subjects in whom it was detected). Incidentally, although daidzein and genistein were detected in all the subjects, equol was detected only in 46 (51.6%) of the 95 subjects.

Furthermore, women with paramenia and those within 5 years of the menopause being taken together as menopausal subjects, a questionnaire survey was conducted using 17 items which are in routine use in the diagnosis of menopausal syndrome [17 items as a modification of Kupperman menopausal index (Kupperman H. S., et al., (1953), J. Clin. Endocrinol. Metabol., 13, 688-703), i.e. 1. hot flushes, 2. perspiration, 3. local sensation of cold, 4. shortness of breath, 5.

numbness of limbs, 6. hypesthesia, 7. difficulty in falling asleep, 8. fitful sleep, 9. irritability, 10. nervousness, 11. melancholy, 12. vertigo, nausea, 13. weakness (fatigue), 14. stiff shoulders, pain in joints, muscular pain, 15. headache, 16. palpitation, 17. tingling sensation] and the simplified menopausal index (SMI) was calculated. With subjects with SMI values not less than 20 being taken as a group of high climacteric symptoms and those with SMI values not greater than 19 as a group of low climacteric symptoms, the amount of intake of isoflavonoids and the urinary excretion of isoflavonoids were respectively compared between the groups.

As a result, whereas no intergroup difference was found in the amount of intake of daidzein, the amount of intake of genistein tended to be lower in the group of high climacteric symptoms at $p = 0.0643$. With regard to the urinary excretions of isoflavonoids, no intergroup difference was found whether for daidzein or for genistein but the excretions of equal were significantly low ($p < 0.01$) in the group of high climacteric symptoms.

From the above results, the inventors found that unidentified clinical symptoms in menopausal women are more closely related to the amount of intake of genistein and the urinary excretion of equal, among various isoflavonoids.

In the past the relationship of the amounts of intake and urinary excretion of isoflavonoids as a whole to their physiological effect has been discussed without regard to specific kinds of isoflavonoids such as daidzein and
5 genistein but the results of the survey conducted by the inventors in the Japanese middle-aged and elderly women made it clear that not only the amounts of intake and urinary excretion of isoflavonoids in general but also the amount of intake of genistein and the urinary excretion of equol,
10 particularly the rate of metabolic conversion of daidzein to equol, are closely related to unidentified clinical climacteric symptoms in menopausal women.

In another study undertaken by the inventors in healthy adult volunteers (25 - 33 years of age), it was found that
15 the urinary excretions of isoflavonoids (daidzein and genistein) after single ingestion of soy milk, a representative isoflavonoid-containing food, are increased in a dose-related fashion but in subjects who showed no urinary excretion of equol, equol was not detected
20 in the urine even when the amount of intake of soy milk was increased two-fold, indicating the existence of individual difference in the metabolic pathway from daidzein to equol.

It is known that equol, which is a metabolite of
25 daidzein, is not detected in isoflavonoid-containing foods

such as processed soybean products nor is it taken into the body from foods in ordinary diets (K. Reinli, et al., (1996), Nutr. Cancer, 26, 123-148).

Based on the above findings the inventors did further
5 research and, as a result, succeeded in the development of a novel composition which comprises a strain of microorganism having the ability (metabolic activity) to elaborate equol from daidzein and either daidzein or a suitable substance containing daidzein in combination, and
10 a novel composition which comprises equol obtained by causing said strain of microorganism to assimilate daidzein. The inventors then discovered that the intake of whichever of the above compositions is effective in the prevention and alleviation of unidentified clinical syndrome in
15 middle-aged and older women and have accordingly developed the instant invention.

DISCLOSURE OF INVENTION

The present invention in a first aspect provides a composition, in the form of a food or a pharmaceutical product,
20 which comprises a daidzein-containing substance and a strain of microorganism capable of metabolizing daidzein to equol as essential ingredients (which composition will hereinafter be referred to as "isoflavone-containing composition").

25 The present invention in a second aspect provides a

composition, in the form of a food or a pharmaceutical product, which comprises equol which is obtained by causing a strain of microorganism capable of metabolizing daidzein to equol to act upon a daidzein-containing substance (which
5 composition will hereinafter be referred to as "equol-containing composition").

The present invention further provides said isoflavone-containing composition and equol-containing composition wherein the strain of microorganism capable
10 of metabolizing daidzein to equol is at least one member selected from the group consisting of Bacteroides ovatus, Streptococcus intermedius and Streptococcus constellatus and more particularly said isoflavone-containing composition and equol-containing composition wherein said
15 strain of microorganism is at least one member selected from the group consisting of Bacteroides E-23-15, which has been deposited as FERM BP-6435, Streptococcus E-23-17, which has been deposited as FERM BP-6436, and Streptococcus A6G-225, which has been deposited as FERM BP-6437.

20 The present invention further provides said isoflavone-containing composition and equol-containing composition which further contain at least one ingredient that favors the maintenance and growth of said strain of microorganism, for example at least one substance selected
25 from the group consisting of galactosylsucrose,

soybean-oligosaccharide, lactulose, lactitol and fructo-oligosaccharide.

The present invention further provides said isoflavone-containing composition and equol-containing
5 composition wherein said daidzein-containing substance further contains at least one member selected from the group consisting of genistein, daidzin and genistin, more preferably soya isoflavone.

The present invention further provides said
10 isoflavone-containing composition and equol-containing composition for the prevention and treatment of unidentified clinical syndrome in middle-aged to elderly women, inclusive of menopausal syndrome.

The present invention further provides said
15 isoflavone-containing composition and equol-containing composition in the form of a food which is selected from the group consisting of drinks, dairy products, fermented milk, bars, granules, powders, capsules and tablets.

The present invention further provides said
20 isoflavone-containing composition and equol-containing composition in the form of a pharmaceutical product which is selected from the group consisting of aqueous solutions, emulsions, granules, powders, capsules and tablets.

The present invention in a further aspect provides
25 a method for prevention and treatment of unidentified

clinical syndrome or menopausal syndrome in middle-aged to elderly women which comprises administering an effective amount of said isoflavone-containing composition or equol-containing composition to a middle-aged or elderly woman in whom said prevention or treatment are needed.

The present invention further provides the use of a microorganism capable of utilizing a daidzein-containing substrate or daidzein to produce equol for the production of said isoflavone-containing composition and equol-containing composition which are effective for the prevention and treatment of unidentified clinical syndrome or menopausal syndrome in middle-aged to elderly women.

The present invention further provides a method of producing equol which comprises causing a strain of microorganism capable of metabolizing daidzein to equol to act upon daidzein.

The present invention further provides a strain of microorganism selected from the group consisting of Bacteroides E-23-15, which has been deposited as FERM BP-6435, Streptococcus E-23-17, which has been deposited as FERM BP-6436, and Streptococcus A6G-225, which has been deposited as FERM BP-6437.

The isoflavone-containing composition of the invention is now described in detail.

In the isoflavone-containing composition of the

invention, a daidzein-containing substance is used as one of its essential ingredients. This daidzein-containing substance includes not only daidzein as such but also daidzin which is a glycoside of daidzein and a variety of substances containing daidzein and/or daidzin. The daidzein present itself chiefly in soybean, kudzu and the like raw foods, their processed products such as tofu, aburage, soy milk, etc. and their fermentation products such as natto, soy sauce, miso, tempeh, etc. In the present invention, any of such raw foods, processed products and fermentation products can be used as said daidzein-containing substance. Particularly, the substances contain not only daidzein but also other isoflavonoids having estrogen-like activity, such as genistein, daidzin, genistin, etc., biochain A and formonetin which is a partially methylated precursor of genistein and daidzein, respectively, etc. and can be used with advantage for the purpose of the invention.

The daidzein-containing substance which is preferred for the practice of the present invention further includes soya isoflavone derived from soybeans, for example commercial products such as "Fujiflavone (trade name) P10" from Fujicco, and isoflavonoids derived from plants such as red clove, alphalpa, etc.

In the isoflavone-containing composition of the invention, a strain of microorganism having an ability

(metabolic activity) to produce equol from daidzein is used as the other essential ingredient. The microorganism includes those belonging to Bacteroides ovatus, Streptococcus intermedius, and Streptococcus constellatus.

5 Particularly preferred among such microorganisms are Bacteroides E-23-15 (FERM BP-6435), Streptococcus E-23-17 (FERM BP-6436) and Streptococcus A6G-225 (FERM BP-6437), all of which were isolated from human stools and deposited for accession by the inventors.

10 The bacteriological characteristics of those strains of microorganisms are now described in detail.

(1) Bacteroides E-23-15, FERM BP-6435

I. Cultural characters

When cultured anaerobically using an anaerobic jar
15 stuffed with steel wool at 37°C for 48 hours, this strain gives good to moderate growth on Eggerth-Gagnon (EG) agar, Blood Liver (BL) agar, or Gifu Anaerobic Medium (GAM). The colonies are circular, protuberant in a convex manner, with both the surface and peripheral edges being glabrous to
20 slightly coarse. The colony color is grayish white on EG agar or grayish brown on BL agar. Morphologically it is a gram-negative rod and shows polymorphism ranging from coccobacillus, single rod, elongated rod, etc., but the cells occur singly and not in chains. No sporogenesis is
25 found.

II. Physiological characteristics

- (1) Optimum temperature for growth: 37°C
- (2) Optimum pH for growth: 7.0
- (3) Liquefaction of gelatin: +
- 5 (4) Hydrolysis of soluble starch: +
- (5) Hydrolysis of esculin: +
- (6) Indole production: -
- (7) Urease: -
- (8) Catalase: -
- 10 (9) Assimilation of carbon sources:
 - L-arabinose +
 - D-xylose +
 - D-glucose +
 - Sucrose +
 - 15 L-Rhamnose +
 - D-Raffinose +
 - D-Mannitol +
 - Indole +
 - Lactose +
 - 20 Maltose +
 - Salicin +
 - Gelatin +
 - Glycerin +
 - D-cellobiose +
 - 25 D-mannose +

D-melezitose +

D-sorbitol +

D-trehalose +

- 5 (10) Organic acid composition after utilization of peptone
or glucose:

Using PYF (peptone-yeast extract-Fildes) medium
(containing about 5% of peptone), which is utilized in sugar
fermentation test, and PYF medium supplemented with 0.5%
final concentration of glucose, the strain was cultured
10 anaerobically at 37°C for 72 hours and the organic acids
in the resulting culture were assayed by HPLC. The results
(unit: mM) are shown below.

Organic acid	PYF culture	Glucose-PYF Culture
Maleic acid	0.02	1.19
Succinic acid	0.01	3.20
Lactic acid	0.01	4.94
Formic acid	0.03	0.66
Acetic acid	0.29	2.62
Pyroglutamic acid	0.01	nd
Propionic acid	nd	nd
i-Butyric acid	1.71	0.23
n-Butyric acid	0.36	nd
i-Valeric acid	nd	0.19
n-Valeric acid	nd	nd

nd = not detected

The above morphological and biochemical characteristics, sugar fermentation test and organic acid production spectrum suggested that this strain was either of the gram-negative rods Bacteroides ovatus and Bacteroides uniformis but was decided to be a microorganism belonging to Bacteroides ovatus in view of its ability to utilize rhamnose. Accordingly this strain was named Bacteroides E-23-15 and deposited with National Institute of Bioscience and Human Technology (NIBH, Higashi 1-1-3, Tsukuba-shi, Ibaraki, Japan) as of July 7, 1997 under the accession number of FERM P-16312. This deposit was converted to a Budapest deposit on July 22, 1998 and assigned the accession number of FERM BP-6435.

(2) Streptococcus E-23-17 (FERM BP-6436)

I. Cultural characteristics

When cultured anaerobically in an anaerobic jar stuffed with steel wool at 37°C for 48 hours, this strain gives good to moderate growth on EG agar, BL agar or GAM. The colonies are circular and conical to protuberant in a centrally convex fashion, and have a ground glass-like to granular texture with a smooth or slightly coarse edge. The colonies on EG agar are transparent to grayish brown. Morphologically it is a gram-positive coccus, ellipsoidal or with slightly pointed ends. The cells occur singly or are diplococcal, forming irregular masses. No chain is formed. The strain is not sporogenic.

II. Physiological characteristics

- (1) Optimum temperature for growth: 37°C
- (2) Optimum pH for growth: 7.0
- 15 (3) Liquefaction of gelatin: -
- (4) Hydrolysis of soluble starch: -
- (5) Hydrolysis of esculin: +
- (6) Indole production: -
- (7) Urease: -
- 20 (8) Catalase: -
- (9) Assimilation of carbon sources:

L-arabinose	+
D-xylose	-
D-glucose	+
25 Sucrose	-

	L-Rhamnose	+
	D-Raffinose	-
	D-Mannitol	+
	Indole	-
5	Lactose	+
	Maltose	+
	Salicin	+
	Gelatin	-
	Glycerin	-
10	D-cellobiose	+
	D-mannose	+
	D-melezitose	-
	D-sorbitol	±
	D-trehalose	+

- 15 (10) Organic acid composition after utilization of peptone or glucose:

Using PYF (peptone-yeast extract-Fildes) medium (containing about 5% of peptone), which is utilized in sugar fermentation test, and PYF medium supplemented with 0.5%
 20 final concentration of glucose, the strain was cultured anaerobically at 37°C for 72 hours and the organic acids in the resulting culture were assayed by HPLC. The results (unit: mM) are shown below.

Organic acid	PYF culture	Glucose-PYF Culture
Maleic acid	0.04	Nd
Succinic acid	2.37	0.02
Lactic acid	0.02	nd
Formic acid	0.03	0.03
Acetic acid	3.32	0.07
Pyroglutamic acid	0.03	nd
Propionic acid	3.24	nd
i-Butyric acid	4.17	1.11
n-Butyric acid	nd	nd
i-Valeric acid	4.50	nd
n-Valeric acid	nd	nd

nd = not detected

The above morphological and biochemical characteristics, sugar fermentation test and organic acid production spectrum suggest that this strain belongs to either of the gram-positive cocci Luminococcus productus and Streptococcus constellatus but the strain differentiates itself from the type culture strain of Luminococcus productus in the ability to utilize sucrose, D-xylose and D-raffinose. Therefore, the inventors named the strain Streptococcus E-23-17 and deposited it with National Institute of Bioscience and Human Technology (NIBH, Higashi 1-1-3, Tsukuba-shi, Ibaraki, Japan) as of July 7, 1997 under the accession number of FERM P-16313. This deposit was subsequently converted to a Budapest deposit as of July 22, 1998 and assigned with the accession number of FERM BP-6436.

(3) Streptococcus A6G-225 (FERM BP-6437)

I. Cultural characteristics

When cultured anaerobically using an anaerobic jar stuffed with steel wool at 37°C for 48 hours, this strain shows good to moderate growth on EG agar, BL agar or GAM. The colonies are circular, conical to protuberant in a centrally convex fashion and have ground glass-like to granular texture with a smooth or slightly coarse peripheral edge. The colonies on EG agar are transparent to grayish white. Morphologically it is a gram-positive coccus, ellipsoidal or with slightly pointed ends. The cells occur singly or are diplococcal, forming irregular masses. No chain is formed. No sporogenesis is found, either.

II. Physiological characteristics

- 15 (1) Optimum temperature for growth: 37°C
- (2) Optimum pH for growth: 7.0
- (3) Liquefaction of gelatin: -
- (4) Hydrolysis of soluble starch: -
- (5) Hydrolysis of esculin: +
- 20 (6) Indole production: -
- (7) Urease: -
- (8) Catalase: -
- (9) Assimilation of carbon sources:
- L-arabinose -
- 25 D-xylose -

	D-glucose	+
	Sucrose	+
	L-Rhamnose	-
	D-Raffinose	+
5	D-Mannitol	-
	Indole	-
	Lactose	+
	Maltose	+
	Salicin	+
10	Gelatin	-
	Glycerin	-
	D-cellobiose	+
	D-mannose	+
	D-melezitose	-
15	D-sorbitol	-
	D-trehalose	-

(10) Organic acid composition after utilization of peptone or glucose:

Using PYF (peptone-yeast extract-Fildes) medium
 20 (containing about 5% of peptone), which is utilized in sugar fermentation test, and PYF medium supplemented with 0.5% final concentration of glucose, the strain was cultured anaerobically at 37°C for 72 hours and the organic acids in the resulting culture were assayed by HPLC. The results
 25 (unit: mM) are shown below.

Organic acid	PYF culture	Glucose-PYF culture
Maleic acid	nd	Nd
Succinic acid	0.21	0.03
Lactic acid	nd	35.36
Formic acid	0.55	1.66
Acetic acid	1.35	0.54
Pyroglutamic acid	nd	nd
Propionic acid	nd	nd
i-Butyric acid	2.04	nd
n-Butyric acid	nd	nd
i-Valeric acid	nd	nd
n-Valeric acid	nd	nd

nd = not detected

The above morphological and biochemical characteristics, sugar fermentation test and organic acid production spectrum suggest that this strain belongs to the gram-positive Streptococcus intermedius but the strain differentiates itself from the type culture strain of S. intermedius in the ability to utilize L-rhamnose and D-trehalose. Therefore, the inventors named the strain Streptococcus A6G-225 and deposited it with National Institute of Bioscience and Human Technology (NIBH, Higashi 1-1-3, Tsukuba-shi, Ibaraki, Japan) as of July 7, 1997, with the accession number of FERM P-16314 assigned. This deposit was subsequently converted to a Budapest deposit as of July 22, 1998 and assigned with the accession number of FERM BP-6437.

The above three strains of microorganisms isolated by the inventors have the ability to utilize daidzein to

elaborate equol as their most outstanding characteristic. The daidzein includes daidzein as the aglycone of an isoflavone glycoside such as daidzin. Daidzin is utilized by said microorganisms to give daidzein, and equol is then
5 produced from this daidzein.

There has been no report on such a microorganism capable of producing equol. Therefore, the present invention further provides novel strains of microorganisms having the ability to produce equol.

10 The above strain of microorganism for use as an essential ingredient of the isoflavone-containing composition of the invention may generally be the live microorganism as such. However, it is not limited thereto but includes its culture, a crude or purified product thereof,
15 and their lyophilizates. Its proportion is not particularly restricted but can be judiciously selected according to the kind of microorganism, among other factors. For example, in the case of Streptococcus intermedius in fermented milk, the bacterial count is preferably
20 controlled within the range of about 10^8 to 10^9 cells/ml. The bacterial count is determined by inoculating an agar medium with a diluted sample, incubating the inoculated medium anaerobically at 37°C and counting the colonies formed. In the case of other strains of microorganisms, too, the
25 count determined in the above manner can be used as a rule

of thumb.

The isoflavone-containing composition of the invention further preferably contains a nutrient component particularly suited to the maintenance and growth of the particular strain of microorganism. The nutrient component includes various oligosaccharides such as galactosylsucrose, soybean-oligosaccharide, lactulose, lactitol, fructo-oligosaccharide, and galacto-oligosaccharide. The formulating amount of such nutrients is not particularly restricted but generally is preferably selected from the range of about 1 to 3 weight % based on the total composition of the invention.

The composition of the invention is generally prepared by blending predetermined amounts of said essential ingredients and other optional ingredients and processing the mixture into a suitable food form or pharmaceutical dosage form, such as drinks, dairy products, fermented milk, bars, granules, powders, capsules, tablets, etc. for food use or aqueous solutions, emulsions, granules, powders, capsules, tablets, etc. for pharmaceutical use. The production of such dosage forms can be carried out in the conventional manner. The carrier for use in the manufacture of such dosage forms includes edible carriers and pharmaceutically acceptable excipients and diluents. Particularly in the case of a food form, a palatable and

taste-improving carrier is preferred.

The particularly preferable examples of carrier include such masking agents as trehalose (manufactured by Hayashibara), cyclodextrin, Benekote BMI (manufactured by
5 Kao Corporation), etc.

The blending ratio of said daidzein-containing substance, specific strain of microorganism and optional ingredients used for the maintenance and growth of the microorganism is not particularly critical. However,
10 based on 100 g of the composition of the invention, the proportion of the daidzein-containing substance is preferably within the range of about 10-50 mg of daidzein contained therein. On the same basis, the proportion of the microorganism is preferably 10^9 to 10^{10} cells (as viable
15 cells) and that of the oligosaccharide is preferably within the range of about 1-5 g.

Since the isoflavone-containing composition of the invention contains a strain of microorganism (primarily live cells) as mentioned above, the composition preferably
20 should not be subjected to heating and/or pressurization in the course of processing into final products. Therefore, in processing the composition of the invention into such dosage forms as bars, granules, powders, tablets, etc., it is preferable to add the microorganism as lyophilized
25 cells as such or lyophilized cells coated with a suitable

coating agent.

The composition of the invention may be optionally supplemented with various other food ingredients having nutritional values or various additives which are

5 conventionally used in the manufacture of pharmaceutical products. The food ingredients mentioned above include calcium, vitamin B, vitamin D, vitamin C, vitamin E and vitamin K (particularly MK-7 (menaquinone-7) derived from Bacillus natto). Other examples of the substances that

10 can be added include zinc and selenium.

The resulting isoflavone-containing composition of the invention is useful for the prevention and treatment of unidentified clinical syndrome, postmenopausal osteoporosis and other menopausal syndrome and symptoms

15 in middle-aged and older women. Such prevention and treatment are achieved by administering or ingesting an effective amount of the above composition of the invention to a middle-aged or elderly woman who needs such prevention or treatment. The effective amount of the composition is

20 not particularly restricted insofar as the prevention and treatment of unidentified clinical syndrome, postmenopausal osteoporosis or menopausal syndrome can be achieved with it. In general, the effective amount is preferably such that about 10-50 mg/day of daidzein and

25 at least about 10 mg/day of genistein can be taken.

The equol-containing composition of the invention is now described in detail.

The equol-containing composition of the invention comprises equol obtainable by causing a strain of
5 microorganism capable of utilizing daidzein to produce equol to act upon a daidzein-containing substance.

The strain of microorganism may be the same as that of the above-described isoflavone-containing composition of the invention. The daidzein-containing substance on
10 which said microorganism is caused to act can also be the same as that mentioned for the isoflavone-containing composition of the invention, thus including an isolated and purified form of daidzein, food materials containing it, processed matters or fermentation products thereof,
15 soya isoflavone and isoflavones derived from kudzu, red clove, alphalpa, etc., products containing such isoflavones, for example tofu, soy milk, boiled soybeans, natto, soybean hypocotyl extract, etc.

The equol-containing composition of the invention is
20 very safe because the active ingredient thereof is a native substance as mentioned above. Moreover, since it is prepared by using a microorganism, the composition is not only free from contamination with chemicals and the like contaminants but also advantageous in that it can be obtained
25 in high yield and at low production cost.

The equol-containing composition of the invention can be produced by conventional fermentation technology utilizing said daidzein-containing substance, preferably soya isoflavone or a food material containing it, as the substrate.

More particularly, the technology comprises sterilizing the substrate in solution form, adding the predetermined strain of microorganism thereto, and incubating the mixture at 37°C either under anaerobic conditions or under aerobic stationary conditions for about 48-96 hours to let fermentation proceed. (Where necessary, a pH control agent, a reducing substance (e.g. yeast extract, vitamin K₁) can be added).

Taking Streptococcus intermedius as an example, the above cultural process can be more preferably carried out as follows. First, daidzein is dissolved in the range of 0.01-0.5 mg/ml in Modified GAM (Modified Gifu Anaerobic Medium) for culture of anaerobic bacteria. A seed culture prepared by growing the microorganism in Modified GAM for about 14 hours is then inoculated into the above daidzein-containing Modified GAM. The inoculum size may be 1/100 by volume of the medium. The incubated medium is incubated aerobically at 37°C under stationary conditions for 48-96 hours.

The present invention further provides a method of

producing equol utilizing such a strain of microorganism.

In the above fermentation system, there may be incorporated a nutrient which is particularly suited for the maintenance and growth of the microorganism. The
5 nutrient includes oligosaccharides such as galactosyl-sucrose, soybean-oligosaccharide, lactulose, lactitol, fructo-oligosaccharide, and galacto-oligosaccharide. The amount of said nutrient is not particularly restricted but is preferably selected from the range of generally about
10 1-3 weight % based on the total composition of the invention.

The desired equol-containing culture broth can thus be obtained.

Isolation and purification of equol from the fermentation broth can be carried out in the conventional
15 manner. A typical procedure may comprise adsorbing the fermentation broth on an ion exchange resin (e.g. DIAION HP20, Mitsubishi Kasei Corporation), eluting the objective substance with methanol, and concentrating the active fraction to dryness to provide crude equol.

20 The equol-containing composition of the invention can be produced, in a suitable food form or pharmaceutical dosage form, by formulating the equol-containing culture broth prepared as above or equol isolated therefrom with other optional food materials.

25 The food form includes drinks, milk products,

fermented milk, bars, granules, powders, capsules, and tablets. The pharmaceutical dosage form includes aqueous solutions, emulsions, granules, powders, capsules and tablets. Those food or pharmaceutical dosage forms can
5 each be manufactured by the established technology. The carrier for use in the manufacture of such forms may be any of edible carriers and pharmaceutically acceptable excipients and diluents. Particularly in the case of foods, the carrier is preferably a palatable, taste-improving
10 carrier.

The amount of equol in the resulting composition of the invention is not particularly restricted but can be determined according to the intended food form or pharmaceutical dosage form. Usually, however, based on
15 100 g of the total composition, the amount of equol is preferably about 10-50 mg.

The amount of intake of the composition of the invention is not particularly restricted but can be generally selected so that the urinary excretions of equol
20 after ingestion of the composition will not be less than 5 μ mole/day.

The equol-containing composition of the invention is useful for the prevention and treatment of unidentified clinical syndrome in middle-aged to elderly women,
25 typically symptoms of postmenopausal osteoporosis and

menopausal syndrome.

BEST MODE FOR CARRYING OUT THE INVENTION

For a further detailed description of the invention, examples of preparation of the isoflavone-containing composition and equol-containing composition of the invention and an example of production of equol are presented below. It being to be understood, however, that the scope of the invention is not limited by those examples.

Example 1

10 Preparation of a drink

The ingredients according to the following recipe were weighed and blended to provide the composition of the invention in the form of a beverage.

15	Fermentation broth of water-soluble soybean protein	10 ml
	Galactosylsucrose (55% content)	10.0 g
	Vitamins & minerals	q.s.
	Flavor	q.s.
	Water	q.s.
20	Total	150 ml

The above fermentation broth of water-soluble soybean protein was prepared by dissolving 2.2 g of water-soluble soybean protein in 10 ml of water, adding 10^8 cells of Streptococcus A6G-225 (FERM BP-6437) thereto, and incubating the mixture at 37°C for 48 hours.

Example 2

Preparation of a fermented milk

The ingredients according to the following recipe were weighed and blended to provide the isoflavone-containing composition of the invention in the form of fermented milk.

	Water-soluble soybean protein	2.2 g
	Galactosylsucrose (55% content)	10.0 g
	<u>Streptococcus</u> A6G-225-fermented milk	100 ml
	Vitamins & minerals	q.s.
10	Flavor	q.s.
	Water	q.s.
	Total	50 ml

The water-soluble soybean protein contained about 3-4% of daidzein (as analyzed by high-performance liquid chromatography; the same applies hereinafter). The Streptococcus A6G-225-fermented milk was prepared by adding 10^8 cells of Streptococcus A6G-225 (FERM BP-6437) to 1 liter of milk and incubating the mixture at 37°C for 24 hours.

Example 3

20 Preparation of a fermented soy milk lyophilizate

Using 1 ml of a suspension of about 10^7 cells/ml of Streptococcus A6G-225 (FERM BP-6437), 100 g of soy milk was caused to undergo lactic acid fermentation at 37°C for 24 hours to provide equol. This product was lyophilized.

25 The equol content of this freeze-dried powder was 0.1-0.3

weight %.

The above powder and other ingredients according to the following recipe were weighed and blended to provide the composition of the invention in the form of a fermented

5 soy milk lyophilizate.

	Fermented soy milk lyophilizate	2.2 g
	Excipient	q.s.
	Vitamins & minerals	q.s.
	Flavor	q.s.
10	Total	20 g

As the excipient, 17 g of corn starch was used.

Example 4

Preparation of powders

The ingredients according to the following recipe were
15 weighed and blended to provide the composition of the invention in powdery form.

	Crude soya isoflavone powder	4.1 g
	Galactosylsucrose (55% content)	10.0 g
	<u>Streptococcus</u> E-23-17 lyophilizate	1.0 g
20	Vitamins & minerals	q.s.
	Flavor	q.s.
	Total	20 g

The Streptococcus E-23-17 lyophilizate was prepared by growing Streptococcus E-23-17 (FERM BP-6436) in a
25 suitable liquid growth medium (GAM broth) (37°C, 24-48 hours)

and lyophilizing the resulting culture. The bacterial cell content of this freeze-dried powder was 10^9 - 10^{10} cells/g.

Example 5

5 Preparation of granules

The ingredients according to the following recipe were weighed and blended to provide the composition of the invention in granular form.

	Crude soya isoflavone powder	4.1 g
10	Galactosylsucrose (55% content)	10.0 g
	<u>Streptococcus</u> E-23-17 lyophilizate	1.0 g
	Sorbitol	q.s.
	Vitamins & minerals	q.s.
	Flavor	q.s.
15	Total	20 g

As the Streptococcus E-23-17 lyophilizate, the same freeze-dried powder as in Example 4 was used.

Example 6

(Microbial production of equol)

- 20 Using a water-soluble soya isoflavone material ("Fujiflavone P10", Fujicco) as the substrate, 1 ml of a suspension of 10^7 - 10^9 cells of Streptococcus A6G-225 (FERM BP-6437) in GAM for culture of anaerobic bacteria was added to a 2.2% aqueous solution of the above substrate. The
- 25 mixture was incubated aerobically at 37°C under stationary

conditions for 96 hours and the amount of equol produced in the fermentation broth was measured by HPLC. The concentration of daidzin in the above aqueous solution was 1.083 mg/ml, and the concentration of daidzein was 0.014 mg/ml.

As a result, whereas no equol could be detected in the water-soluble soya isoflavone material, the equol content of the fermentation broth after 96 hours of culture was $613.0 \pm 8.7 \mu\text{g/ml}$ (means of 5 determinations \pm S.D.). Neither daidzin nor daidzein was detected in the fermentation broth.

Using a substrate solution containing 0.01 mg/ml of daidzein (manufactured by Funakoshi, purity $\geq 99\%$) (5 mg of daidzein suspended in 2 ml of special grade methanol and diluted to 50 ml with BHI (brain heart infusion) medium) in lieu of the above water-soluble soya isoflavone material, equol was produced in otherwise the same manner as above.

As a result, the amount of equol in the fermentation broth after 96 hours of culture was $17.9 \pm 1.4 \mu\text{g/ml}$ (mean of 5 determinations \pm S.D.).

It is, therefore, clear that by utilizing the microorganism of the invention, equol can be produced from daidzein with good efficiency.

Example 7

25 Preparation of a drink

	Equol-containing fermentation broth	1.55 g
	Glucose	5.00 g
	Citric acid	0.5 g
	Vitamins & minerals	q.s.
5	Flavor	q.s.
	Water	q.s.
	Total	200 ml

In the same manner as Example 6, 1 ml of a suspension of 10^7 - 10^9 cells of Streptococcus A6G-225 (FERM BP-6437) in GAM for culture of anaerobic bacteria was added to a 2.2% aqueous solution of water-soluble soya isoflavone material ("Fujiflavone P10", Fujicco) and the mixture was incubated aerobically at 37°C under stationary conditions for 96 hours. Using the equol-containing fermentation broth thus obtained and other ingredient according to the above recipe, the composition of the invention in the form of a drink was prepared.

Example 8

Preparation of a bar

20	Equol-containing fermentation broth	1.55 g
	Butter	20.0 g
	Sugar	20.0 g
	Salt	Small amount
	Egg	1/2
25	Wheat flour	80.0 g

Vitamins & minerals	q.s.
Flavor	q.s.
Milk	30.0 g

- Using the equol-containing fermentation broth
- 5 described in Example 7 in accordance with the above recipe, a dough was prepared, molded into a suitable bar form, and baked in an oven at 170°C for 15 minutes to provide a cake bar.

Example 9

10 Preparation of a jelly

Equol-containing fermentation broth	1.55 g
Fruit juice	50.0 g
Sugar	50.0 g
Agar	2.5 g
15 Vitamins & minerals	q.s.
Flavor	q.s.

- Using the equol-containing fermentation broth
- described in Example 7 in accordance with the above recipe, the respective ingredients were heated up to 90°C with
- 20 constant stirring to dissolve the agar and the whole amount was poured into a suitable cup and cooled for gelation at 5-10°C to provide the composition of the invention in the form of a jelly.

INDUSTRIAL APPLICABILITY

- 25 The composition of the invention, when caused to be

ingested or administered in the form of a food or a pharmaceutical product, proves useful for the prevention and alleviation of unidentified clinical syndrome or menopausal syndrome in middle-aged to elderly women.

CLAIMS

1. A composition comprising a daidzein-containing substance and a strain of microorganism capable of
5 metabolizing daidzein to equol as essential ingredients.

2. The composition according to Claim 1 wherein the strain of microorganism capable of metabolizing daidzein to equol is at least one member selected from the group consisting of Bacteroides ovatus, Streptococcus
10 intermedius and Streptococcus constellatus.

3. The composition according to Claim 1 wherein the strain of microorganism capable of metabolizing daidzein to equol is at least one member selected from the group consisting of Bacteroides E-23-15, which has been deposited
15 as FERM BP-6435, Streptococcus E-23-17, which has been deposited as FERM BP-6436, and Streptococcus A6G-225, which has been deposited as FERM BP-6437.

4. The composition according to Claim 1 which further contains at least one component that favors the
20 maintenance and growth of the strain of microorganism capable of metabolizing daidzein to equol.

5. The composition according to Claim 4 wherein the component that favors the maintenance and growth of the strain of microorganism capable of metabolizing daidzein
25 to equol is at least one substance selected from the group

consisting of galactosylsucrose, soybean-oligosaccharide, lactulose, lactitol and fructo-oligosaccharide.

6. The composition according to Claim 1 wherein the daidzein-containing substance further contains at least
5 one member selected from the group consisting of genistein, daidzin and genistin.

7. The composition according to Claim 1 wherein the daidzein-containing substance is soya isoflavone.

8. The composition according to Claim 1 for the
10 prevention and treatment of unidentified clinical syndrome in middle-aged to elderly women, inclusive of menopausal syndrome.

9. The composition according to Claim 8 which is in a food form.

10. The composition according to Claim 9 wherein the
15 food form is selected from the group consisting of drinks, dairy products, fermented milk, bars, granules, powders, capsules and tablets.

11. The composition according to Claim 8 which is
20 a pharmaceutical dosage form.

12. The composition according to Claim 11 wherein the pharmaceutical dosage form is selected from the group consisting of aqueous solutions, emulsions, granules, powders, capsules and tablets.

25 13. A method for prevention and treatment of

unidentified clinical syndrome or menopausal syndrome in middle-aged to elderly women which comprises administering an effective amount of the composition according to claim 1 to a middle-aged or elderly woman who needs said prevention and treatment.

14. The use of a microorganism capable of utilizing a daidzein-containing substance or daidzein to elaborate equol for the production of a composition which is effective for the prevention and treatment of unidentified clinical syndrome or menopausal syndrome in middle-aged to elderly women.

15. A composition comprising equol which is obtained by causing a strain of microorganism capable of metabolizing daidzein to equol to act upon a daidzein-containing substance.

16. The composition according to Claim 15 wherein the strain of microorganism capable of metabolizing daidzein to equol is at least one member selected from the group consisting of Bacteroides ovatus, Streptococcus intermedius and Streptococcus constellatus.

17. The composition according to Claim 15 wherein the strain of microorganism capable of metabolizing daidzein to equol is at least one member selected from the group consisting of Bacteroides E-23-15, which has been deposited as FERM BP-6435, Streptococcus E-23-17, which

has been deposited as FERM BP-6436, and Streptococcus
A6G-225, which has been deposited as FERM BP-6437.

18. The composition according to Claim 15 which
further contains at least one component that favors the
5 maintenance and growth of the strain of microorganism
capable of metabolizing daidzein to equol.

19. The composition according to Claim 15 wherein
the component that favors the maintenance and growth of
the strain of microorganism capable of metabolizing
10 daidzein to equol is at least one substance selected from
the group consisting of galactosylsucrose,
soybean-oligosaccharide, lactulose, lactitol and
fructo-oligosaccharide.

20. The composition according to Claim 15 wherein
15 said daidzein-containing substance further contains at
least one member selected from the group consisting of
genistein, daidzin and genistin.

21. The composition according to Claim 15 wherein
the daidzein-containing substance is soya isoflavone.

20 22. The composition according to Claim 15 for the
prevention and treatment of unidentified clinical syndrome
in middle-aged to elderly women, inclusive of menopausal
syndrome.

23. The composition according to Claim 22 which is
25 in a food form.

24. The composition according to Claim 23 wherein the food form is selected from the group consisting of drinks, dairy products, fermented milk, bars, granules, powders, capsules and tablets.

5 25. The composition according to Claim 22 which is a pharmaceutical dosage form.

26. The composition according to Claim 25 wherein the pharmaceutical dosage form is selected from the group consisting of aqueous solutions, emulsions, granules,
10 powders, capsules and tablets.

27. A method for prevention and treatment of unidentified clinical syndrome or menopausal syndrome in middle-aged to elderly women which comprises administering an effective amount of the composition according to claim
15 15 to a middle-aged or elderly woman who needs said prevention and treatment.

28. The use of a microorganism capable of utilizing a daidzein-containing substance or daidzein to elaborate equol for the production of a composition which is effective
20 for the prevention and treatment of unidentified clinical syndrome or menopausal syndrome in middle-aged to elderly women.

29. A method of producing equol which comprises causing a strain of microorganism capable of metabolizing
25 daidzein to equol to act upon daidzein.

30. The method according to claim 29 wherein the strain of microorganism capable of metabolizing daidzein to equol is at least one member selected from the group consisting of Bacteroides ovatus, Streptococcus intermedius and Streptococcus constellatus.

31. The method according to Claim 29 wherein the strain of microorganism capable of metabolizing daidzein to equol is at least one member selected from the group consisting of Bacteroides E-23-15, which has been deposited as FERM BP-6435, Streptococcus E-23-17, which has been deposited as FERM BP-6436, and Streptococcus A6G-225, which has been deposited as FERM BP-6437.

32. A strain of microorganism selected from the group consisting of Bacteroides E-23-15, which has been deposited as FERM BP-6435, Streptococcus E-23-17, which has been deposited as FERM BP-6436, and Streptococcus A6G-225, which has been deposited as FERM BP-6437.

ABSTRACT

This invention provides a composition comprising a daidzein-containing substrate and a strain of microorganism
5 capable of metabolizing daidzein to equol as essential ingredients. This composition is effective in the prevention and alleviation of unidentified clinical syndrome inclusive of menopausal syndrome in middle-aged to elderly women for which no effective means of prevention
10 or alleviation has heretofore been available.